

# Univerzita Karlova

## Přírodovědecká fakulta

Molekulární biologie a biochemie organismů

Speciální chemicko-biologické obory



Ondřej Špika

## Polioviry a poliovirové vakcíny

## Polioviruses and poliovirus vaccines

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Alena Drda Morávková, MBA, Ph.D.

Praha, 2019



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2019

.....  
Ondřej Špika

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval vedoucí práce RNDr. Aleně Drdě Morávkové, MBA, Ph.D. za její věcné rady, odborný dohled a věnovaný čas. Dále bych chtěl poděkovat Barboře Zeithamlové za její pomoc při revizi práce.

## Abstrakt

Jednou z chorob, se kterým lidstvo úspěšně bojuje již více jak půl století, je dětská obrna. Virus poliomyelitidy, jenž nemoc způsobuje, může v některých případech napadat nervové buňky ovládající končetiny a způsobit tak jejich ochrnutí. Obzvláště nebezpečné pak mohou být případy napadení neuronů ovládajících dýchací svalstvo, kdy bez pomoci může dojít až k úmrtí. Hlavně díky zásluze vědců Salka a Sabina byly vytvořeny dvě vakcíny, které i přes své nedostatky úspěšně zredukovaly celosvětovou incidenci dětské obrny o 99 %. Přesto však na světě zůstávají místa, kde není žádná vakcína běžně dostupná, a kde se virus stále endemicky vyskytuje. Salkova vakcína, která se začala používat jako první, využívá k vyvolání imunitní odpovědi inaktivovaného viru. Její nevýhodou je však nižší efektivita. O několik let později přišel Sabin se svojí vakcínou obsahující živý atenuovaný virus, neschopný zničit lidské nervové buňky. Sabinova vakcína dobyla svět jednoduchým orálním podáváním a vysokou účinností. Nevýhodou, která vyvstává obzvláště dnes, jsou reverzní mutace viru a potenciální vznik patogenní formy. Tento od vakcíny odvozený virus pak může v místech s nízkou proočkovaností způsobovat lokální vypuknutí onemocnění. Proto se dnes upouští od používání Sabinovy vakcíny a preferuje se používání vakcíny Salkovy, případně spolu s posilujícími látkami. Vědci však dále hledají nové způsoby ochrany proti polioviru s cílem jeho eradikace.

**Klíčová slova:** poliovirus, dětská obrna, poliovirus odvozený z vakcinačních virů, vakcíny

## **Abstract**

Polio is one of the diseases that humanity has been successfully fighting for more than half a century. The poliomyelitis virus that causes the disease can in some cases attack the nerve cells controlling the limbs and cause their paralysis. Especially dangerous are then the cases of infections of the respiratory neurons, which can lead to death without help. Mainly thanks to the scientists Salk and Sabin, two vaccines were created which, despite their disadvantages, successfully reduced the worldwide incidence of polio by 99%. However, there are still places where no vaccine is commonly available and where the virus is still endemic. The Salk vaccine, which was used first, uses an inactivated virus to prompt an immune response. However, its disadvantage is lower efficiency. Several years later, Sabin came with his live attenuated vaccine, unable to destroy human nerve cells. Sabin's vaccine conquered the world with simple oral administration and high efficacy. The disadvantage, which arises especially today, is the possibility of reverse mutation of the virus and the formation of pathogenic forms. This vaccine-derived virus can cause local outbreaks at low vaccination sites. Therefore, the use of the Sabine vaccine is being abandoned in favor of the Salk vaccine, possibly along with boosters. But scientists are still looking for new ways of protecting against poliovirus and eradicating it.

**Keywords:** poliovirus, polio, vaccine derived poliovirus, vaccines

## Seznam použitých zkratk

<b>CNS</b>	Centrální nervová soustava	<b>PAI</b>	Poliovirus Antivirals Initiative / iniciativa antivirotik proti polioviru
<b>CAP</b>	5' čepička	<b>PI4K3β</b>	Fosfatidylinositol-4-kináza 3β
<b>CBP</b>	Cap binding protein / čepičku vážící protein	<b>PI4P</b>	Fosfatidylinositol-4-fosfát
<b>CRE</b>	Cis-acting replication element / cis-působící replikační element	<b>Poly(A)</b>	polyadenylace
<b>eIF</b>	Eukaryotické iniciační faktory	<b>PPS</b>	Postpolio syndrome / poobrnový syndrom
<b>ER</b>	Endoplasmatické retikulum	<b>PRO</b>	proteáza
<b>GA</b>	Golgiho aparát	<b>PTB</b>	Polypyrimidine tract-binding protein / protein vážící polypyrimidinový úsek
<b>GEF</b>	Guanin Exchange factors / faktory pro výměnu guaninu	<b>PV</b>	Poliovirus
<b>GIT</b>	Gastrointestinální trakt	<b>PVR</b>	Poliovirový receptor
<b>GPEI</b>	Global polio eradication initiative / iniciativa za globální vyhubení dětské obrny	<b>RdRp</b>	RNA dependentní RNA polymeráza
<b>GTP</b>	Guanosintrifosfát	<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina
<b>IPV</b>	Inactivated polio vaccine / inaktivovaná vakcína proti polioviru	<b>VAPP</b>	Vaccine associated paralytic poliomyelitis / paralitická poliomyelitida asociovaná s vakcínou
<b>IRES</b>	internal ribosomal entry site / vnitřní místo pro vstup ribosomu	<b>VDPV</b>	Vaccine derived poliovirus / poliovirus odvozený z vakcinačních virů
<b>mRNA</b>	Messengerová RNA	<b>VP</b>	Virový protein
<b>OPV</b>	Oral polio vaccine / orální vakcína proti polioviru	<b>VPg</b>	Viral protein genome-linked / virový protein spojený s genomem
<b>ORF</b>	Open reading frame / otevřený čtecí rámec	<b>wt-PV</b>	Wild type poliovirus / divoký poliovirus
<b>PABP</b>	Poly(A) binding protein / poly(A) vazebný protein		

# Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Charakterizace polioviru .....	2
2.1.	Struktura virionu.....	2
2.2.	Genom .....	2
2.3.	Životní cyklus viru.....	4
2.3.1.	Vstup do hostitele a do buňky .....	4
2.3.2.	Translace.....	5
2.3.3.	Replikace a transkripce.....	6
2.3.4.	Enkapsidace a opuštění buňky.....	9
2.4.	Sérotypy a jejich rozšíření .....	9
2.5.	Patogenita a klinické symptomy.....	10
3.	Vakcíny proti polioviru .....	11
3.1.	Inaktivovaná vakcína .....	11
3.1.1.	Příprava, použití a účinnost .....	11
3.2.	Orální vakcína.....	12
3.2.1.	Příprava, použití a účinnost .....	13
3.2.2.	Změny v GI atenuovaného viru.....	13
4.	Paralytická poliomyelitida asociovaná s vakcínou.....	15
5.	Poliovirus odvozený z vakcinačních virů.....	15
6.	Nové postupy ve vývoji vakcín .....	17
7.	Antivirotika .....	18
8.	Závěr.....	20
9.	Seznam literatury.....	21

# 1. Úvod

V polovině 19. století ve Spojených státech amerických a z kraje 20. století v Evropě se začaly objevovat případy lokálních epidemií onemocnění, které do té doby nebylo příliš známé a v literatuře téměř nepopsané (Trevelyan, Smallman-Raynor a Cliff, 2005). Toto onemocnění se projevovalo poškozením centrálního nervového systému (CNS), a následnou paralýzou různých skupin příčně pruhovaných svalů. Původcem tohoto onemocnění byl mezi lety 1908 a 1909 identifikován do té doby neznámý virus. Za jeho objev a popis se zasloužili především Erwin Popper a Karl Landsteiner (Skern, 2010).

*Poliomyelitis anterior acuta* neboli dětská přenosná obrna či Heineova-Medinova nemoc má u většiny nakažených asymptomatický projev či projev mírné horečky, avšak u malého procenta hostitelů dochází k průniku viru do CNS, což má za následek její poškození a následnou paralýzu. Toto onemocnění provází lidstvo minimálně od dob starého Egypta. Důkazem jsou tamní nástěnné kresby, na kterých můžeme vidět postižení odpovídající paralýze po prodělání obrny (Galassi, Habicht a Rühli, 2017). V průběhu dějin se jednalo spíše o vzácnější onemocnění, avšak během 20. století, především v 50. letech, se toto onemocnění rapidně rozšířilo skoro po celém světě a způsobilo smrt a zmrzačení tisíců dětí. (Mehndiratta, Mehndiratta a Pande, 2014).

Po objevení viru následoval mnohaletý výzkum, jenž přispěl k porozumění virové patogenity, replikačního cyklu a antigenních typů. Tyto poznatky umožnily v 60. letech 20. století vývoj dvou druhů vakcín, jež se ukázaly jako vysoce efektivní.



## 2. Charakterizace polioviru

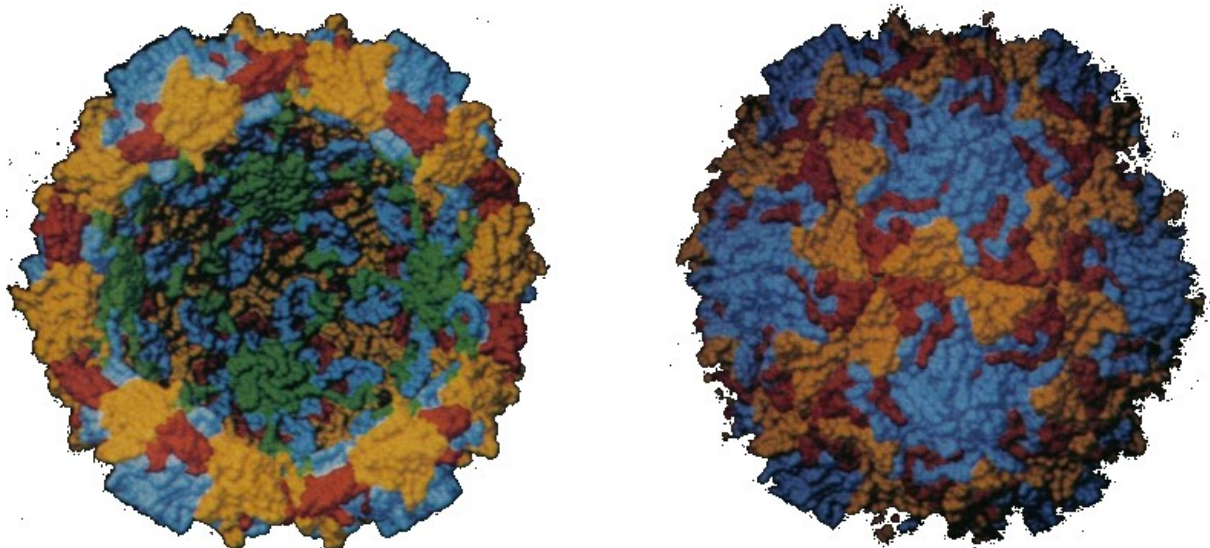
Virus poliomyelitidy (poliovirus, PV) se řadí mezi lidské enteroviry C v rámci rodiny picornavirů. Hostiteli picornavirů jsou především lidé a zvířata, picornaviry napadající rostliny tvoří malou část tohoto řádu. Jedná se o celosvětově rozšířenou čeleď virů, jež mohou kromě ztrát na lidských životech způsobovat i značné škody v chovech dobytka (virus slintavky a kulhavky). Mezi další známé picornaviry napadající člověka patří například virus žloutenky typu A spolu s celou řadou virů způsobujících záněty dýchacího traktu a středního ucha. Onemocnění způsobená picornaviry zahrnují též infekce CNS a gastrointestinálního traktu (GIT), dále také očí, kůže, jater a slinivky. Poliovirus může napadat pouze zástupce infrařádu opic, jelikož je omezen přítomností receptorových molekul (Ida-Hosonuma *et al.*, 2003). Přirozeně však napadá pouze člověka. Možnost experimentálně infikovat opice byla v minulosti dlouho využívána pro výzkumné účely. Na počátku 90. let minulého století byly připraveny transgenní myši exprimující lidský poliovirový receptor (hPVR), což usnadnilo další výzkum polioviru (Ren *et al.*, 1990).

### 2.1. Struktura virionu

Virion polioviru je tvořen neobalenou kapsidou, která má ikosahedrální symetrii a rozměry kolem 30 nm. Kapsidu tvoří 60 strukturních jednotek skládajících se ze 4 kapsidových proteinů (VP). Tyto proteiny tvoří pentamery, 12 pentamerů posléze vytvoří celistvou kapsidu. VP1, VP2 a VP3 tvoří povrch kapsidy, kdežto VP4 je připojen zevnitř kapsidy (Obr. 1). Velikostně jsou si povrchové kapsidové proteiny podobné (kolem 30 kDa), kdežto VP4 je značně menší (kolem 7,5 kDa) (Hogle, Chow a Filman, 1985; Basavappa *et al.*, 1994). Na povrchu kapsidy jsou přítomny žlábký pro poliovirový receptor (PVR) CD155. Rozpoznání tohoto receptoru je klíčové pro vstup virové RNA do buňky (Bowers *et al.*, 2017).

### 2.2. Genom

Genetickou informaci polioviru nese jednovláknová RNA s pozitivní polaritou ((+)ssRNA), která je dlouhá přibližně 7 500 bází (Nomoto, 1982). Tato RNA může být po vnesení do buňky translatována hostitelským aparátem bez potřeby virových proteinů a je tedy sama o sobě infekční.



**Obr. 1:** 3D znázornění vnější a vnitřní struktury kapsidy polioviru.

Na obrázcích je protein VP1 je znázorněn **modrou**, VP2 **žlutou**, VP3 **červenou** a VP4 **zelenou** barvou. Na vnější struktuře jsou dobře pozorovatelné žlábký v proteinu VP1, které slouží pro navázání na poliovirový receptor CD155.

Převzato a upraveno z: (Hogle, Chow a Filman, 1985)

Na 5' konci se nachází netranslatovaná oblast obsahující sekvenci vnitřního ribosomálního vstupního místa (IRES) a malý virový protein spojený s genomem (VPg), který v asociaci s 5' koncem slouží jako primer pro replikaci virového genomu. Funguje tedy jako obdoba eukaryotické 5' čepičky (CAP). Na 3' konci genom obsahuje polyadenylovanou (Poly(A)) oblast zajišťující stabilitu RNA (Pathak *et al.*, 2008). Důležitost IRES místa pro správnou translaci virové RNA ukazuje například nízká neurovirulence atenuovaných kmenů, kdy mutace v rámci IRES sekvence způsobují problémy při translaci či její úplné znemožnění (Honda *et al.*, 1999). Virus také obsahuje enzymy schopné inaktivovat proteiny vázající 5' čepičku (CBPs) (Lee a Sonenberg, 2006). To má za následek sníženou kompetici mezi virovou a hostitelskou RNA a preferenci translace RNA obsahující IRES sekvenci. Kódující část genomu je translatována vcelku a výsledný polyprotein je pak postupně rozštěpen na jednotlivé virové proteiny, kterých je celkem 11 (18 včetně intermediátů).

## 2.3. Životní cyklus viru

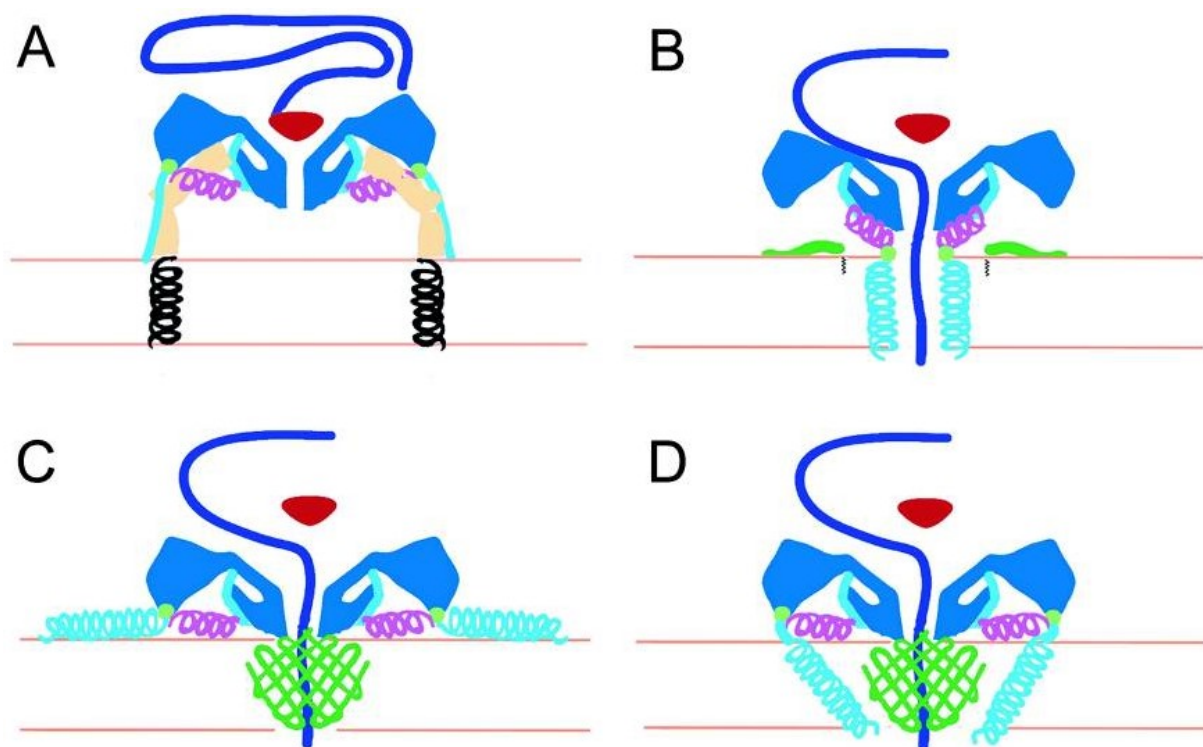
### 2.3.1. Vstup do hostitele a do buňky

Virus vstupuje do organismu orální cestou, přichází tedy do kontaktu s buňkami GIT. První buňky, do kterých vstupuje, jsou epitelální buňky hltanu. Jeho odolnost vůči nízkému pH mu však umožňuje přežít nehostinné podmínky žaludečních kyselin a dostat se tak až do tenkého střeva.

Virus je schopný infikovat buňky díky rozpoznání membránového proteinu CD155, na který je schopen se navázat (Holland a McLaren, 1961; Ren a Racaniello, 1992). Jedná se o transmembránový glykoprotein, který se při běžné buněčné aktivitě podílí především na tvorbě adherentních spojů mezi sousedícími epitelálními buňkami (Maier *et al.*, 2007). Interakcí s CD155 dochází v rámci kapsidy ke konformační změně (Joklik a Darnell, 1961), kdy je VP1 vsunut do buněčné membrány, přičemž formuje pór, jímž je posléze vpraven virový genom do buněčné cytoplasmy (Bubeck *et al.*, 2005).

Hogle (2002) ve své práci navrhl a popsal průběh tvorby póru, kterým je RNA vsunuta do cytoplasmy buňky. Navázáním virionu na receptory buňky za fyziologických teplot dochází ke konformačním změnám a výsledné přeměně virionu na takzvanou částici A (velikost v jednotkách sedimentační konstanty činí 135 S). Během těchto konformačních změn dochází k externalizaci VP1 a N-konce VP4. Následně po zformování částice A dojde k vsunutí 5 kopií VP1 do buněčné membrány, konkrétně jejich N-konců. Tento pohyb je pravděpodobně zprostředkován pomocí myristylové skupiny na N-konci VP4. Díky tomu dochází k tvorbě kanálu, jehož stěny jsou tvořeny amfipatickými helixy proteinů VP1. Jejich hydrofobní části směřují k membráně, hydrofilní dovnitř do dutiny kanálu (Hogle, 2002).

Alternativní variantou je sestavení póru pomocí proteinu VP4, kdy VP1 hraje roli nespecifické membránové kotvy či se spolupodílí na tvorbě kanálu. Tyto alternativy přijímaného modelu jsou znázorněny a detailněji popsány na Obr. 2 (Tuthill *et al.*, 2010).



**Obr. 2:** Znáznornění přijímaného modelu vstupu PV do buňky.

Vysvětlení barev: **modrá** – průřez částí virové kapsidy, **zelená** – VP4, **červená** – VP3  $\beta$  trubice, **tyrkysová a fialová** – N konce VP1, **tmavě modrá** – RNA, **černá** – transmembránová část poliovirového receptoru (PVr), **běžová** – ektodomény 1-3 PVr. **(A)** Navázání PV na membránový receptor CD155 a ireversibilní změna na částici A (I35S). VP3 blokuje výstupní kanál. **(B-D)** Alternativní modely přímého ukotvení viru k membráně skrze N konec PV1 spolu s formací transmembránového póru. Došlo k posunu VP3 a rozšíření kanálu, z něhož se stává kontinuální pór skrze membránu. **(B)** Formování póru především zásluhou amfipatických N konců VP1 (**tyrkysová**), kdy dojde k tvorbě kanálu z 5 helixů. Tento proces provází disociace zbylých VP1 helixů (**fialová**) z těla viru. **(C + D)** Formování póru s VP4 jakožto hlavním proteinem, kdy VP1 se může přímo podílet na tvorbě póru (**D**), nebo slouží jako nespecifická membránová kotva (**C**).

Převzato z: (Bubeck et al., 2005)

### 2.3.2. Translace

Po vstupu genomické (+)ssRNA dochází k translaci hostitelským ribozomálním aparátem. Virová RNA však obsahuje na svém 5' konci kovalentně navázaný protein VPg, který slouží jako primer pro zahájení transkripce (Nomoto *et al.*, 1977). Pro translaci je tedy nutné ho odstranit, k čemuž slouží hostitelský enzym unlinkáza, která má schopnost hydrolyzovat vazbu mezi VPg a pUp na 5' konci RNA s následným odhalením této sekvence a umožněním translace v polyprotein (Gulevich, Yusupova a Drygin, 2002).

Translace probíhá za pomoci hostitelského translačního aparátu. To je umožněno díky přítomnosti IRES sekvence, která slouží jako náhrada pro hostitelem registrovanou CAP strukturu. Následně ribozomy translatují RNA v celistvý polyprotein přibližné délky 3000 aminokyselin (cca 250 kD). Polyprotein je poté postupně štěpen pomocí virových proteáz na individuální proteiny různorodých funkcí, vizte Obr. 3.

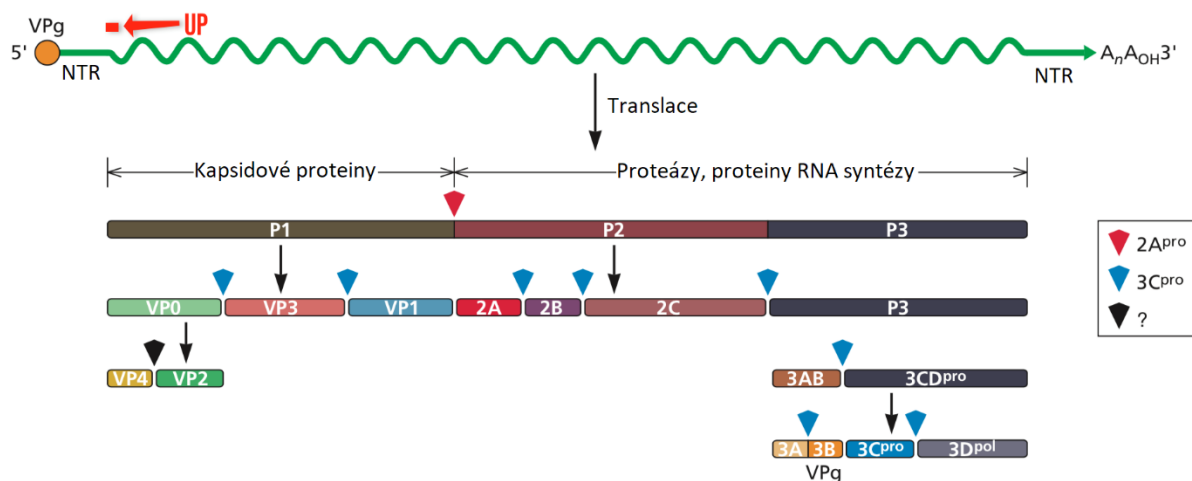
Na začátku roku 2019 však bylo učiněno převratné zjištění, které vyvrací přes 50 let zavedené dogma o translaci genomu picornavirů v jeden jediný polyprotein. Lulla a kol. (2019) našli důkazy exprese dalšího, velmi krátkého otevřeného čtecího rámce (ORF). Domnělý protein, který by měl být tímto ORF kódován, byl nazván UP (upstream ORF protein) (Lulla *et al.*, 2019).

Dle tvrzení autorů je tento protein důležitý pro efektivní replikaci viru v intestinálních buňkách, této důležitosti však pozbývá při pěstování na laboratorních buněčných liniích, což je možný důvod, proč nebyl doposud detekován. Jeho funkcí má být rozrušení buněčných membrán a umožnění viru uniknout z buněčných vezikulů (Lulla *et al.*, 2019). Je zřejmé, že bude potřeba dalších studií, které potvrdí či naopak vyvrátí toto tvrzení.

V pozdější fázi infekce buňky dochází k poškození translačního aparátu pro hostitelské messengerové RNA (mRNA), a to kvůli štěpení eukaryotických iniciačních faktorů (eIF). To má zajistit efektivní translaci virové RNA eliminováním kompetice o ribozomy s hostitelskou mRNA. Faktory eIF jsou za standartních podmínek esenciální pro zahájení CAP-dependentní translace. Štěpení eIF provádí virové proteázy (<sup>pro</sup>), konkrétně 2A<sup>pro</sup> štěpí eIF4G1 a eIF4G2 (Lamphear *et al.*, 1995; Gradi *et al.*, 1998), 3C<sup>pro</sup> štěpí eIF5B (de Breyne *et al.*, 2008) a poly(A) vazebný protein (PABP) (Rivera a Lloyd, 2008). Další způsob omezení exprese hostitelských genů a tím i buněčné antivirové obrany je poškození funkčnosti jaderných pórů. Toho dosahuje virus za pomoci 2A<sup>pro</sup>, která štěpí proteiny p62, Nup98 a Nup153 (Castelló *et al.*, 2009).

### 2.3.3. Replikace a transkripce

Jak již bylo zmíněno, úloha proteinu Vpg skládajícího se z 22 aminokyselin spočívá v primingu transkripce virové RNA. Pro jeho funkčnost je však nejdříve nutná jeho uridylylace. Tu posttranslačně zajišťuje poliovirová RNA dependentní RNA polymeráza (RdRp) 3D<sup>pol</sup>, čímž dojde k tvorbě komplexu VPg – poly(U). (Paul *et al.*, 1998).



**Obr. 3: Genom polioviru a produkty translace.**

Na obrázku je **zeleně** naznačená virová (+)ssRNA, kde na 5' konci je kovalentně navázán VPg a na 3' konci je poly(A) oblast. **Červenou** barvou a šipkou je znázorněna poloha domnělého proteinu UP. Po translaci polyproteinu dochází k prvnímu štěpení *in cis* 2A<sup>pro</sup> (znázorněno **červeným** klínem). **Modré** klíny odpovídají štěpení pomocí 3C<sup>pro</sup>, **černý** klín představuje dosud neznámou proteázu. Předpokládá se, že se jedná o autokatalytické štěpení.

Převzato a upraveno z: <http://www.virology.ws/2018/11/29/the-lost-orf/>

Dále je pro úspěšnou syntézu pozitivní jednovláknové RNA ((+)ssRNA) zapotřebí *cis* působícího replikačního elementu (cre). Cre element sestává ze sekvence v rámci kódující části RNA (pro protein 2C). Tato sekvence vytváří v RNA smyčku, která váže proteiny potřebné pro replikaci dané RNA. Podporuje také uridylylaci VPg zajišťovanou 3D<sup>pol</sup> (Goodfellow *et al.*, 2002).

Replikace a transkripce PV probíhá na buněčných membránách odvozených od endoplasmatického retikula (ER) (Belov *et al.*, 2008). Jelikož je dvouvláknová RNA (dsRNA) buňkou vnímána jako důkaz o virové infekci, na který napadená buňka silně reaguje, je využití izolovaných membránových struktur pro virus výhodné, jelikož při replikaci pravděpodobně dochází k vytvoření právě dsRNA intermediátu (Salonen, Ahola a Kääriäinen, 2005).

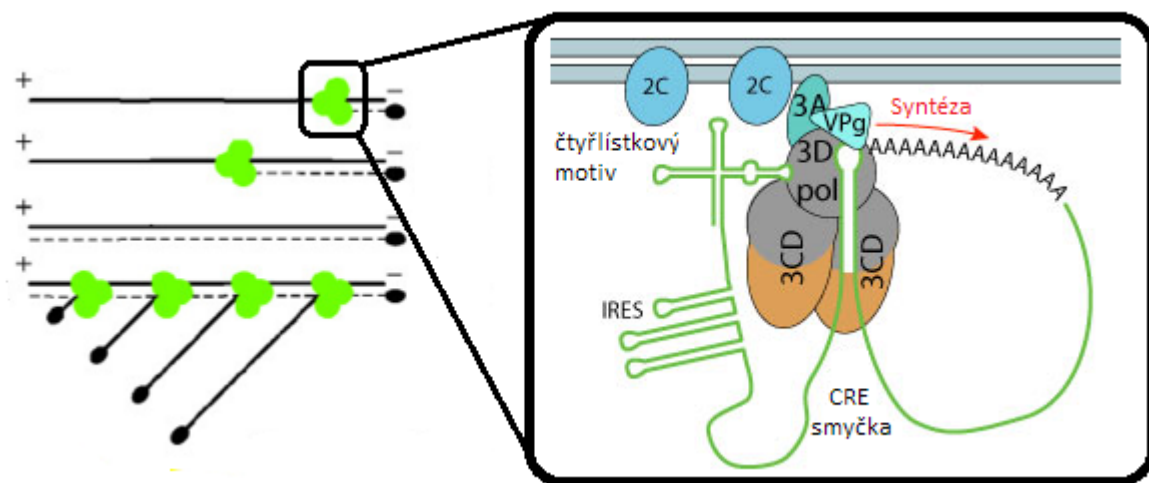
Formování váčků je homologní k anterográdnímu transportu z ER do Golgiho aparátu (GA). Virus využívá hostitelského proteinu COPII, který zajišťuje pučení váčků. Tyto vezikuly však nefúzí s GA jako za fyziologických podmínek, ale shromažďují se v cytoplasmě (Rust *et al.*, 2001).

Ve vytvořených váčcích dochází k využití proteinů z rodiny Arf. Jedná se o proteiny s GTPázovou aktivitou, které kontrolují sekreční dráhy. Činností virových proteinů 3A a 3CD jsou pomocí faktorů pro výměnu guaninových nukleotidů (GEFs) tyto Arf proteiny zabudovány

do membrány vezikulu. Arf proteiny se posléze podílí na vzniku prostředí bohatého na fosfatidylinositol-4-fosfát (PI4P), které je pro replikaci virové RNA zásadní. Díky těmto proteinům zde dochází k preferenčnímu zisku fosfatidylinositol-4-kinázy 3 $\beta$  (PI4K3 $\beta$ ) na úkor obalových proteinů. Výsledkem této činnosti je vznik PI4P obohacených organelových struktur. (Belov *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2010).

Při replikaci pracuje RdRp 3D<sup>pol</sup> kooperativně v planárních a tubulárních strukturách, čímž se zvyšuje celková efektivita procesu (Lyle *et al.*, 2002). 3D<sup>pol</sup> v komplexu s RNA, cre sekvencí a čtyřlístkovou oblastí na 5' konci RNA zahájí s pomocí Vpg syntézu negativního vlákna RNA ((-) ssRNA) (Obr. 4). Vzniká tak dsRNA intermediát, kde negativní vlákno slouží pro tvorbu genomické (+)ssRNA.

Pro transkripci je opět nutná virová RdRp 3D<sup>pol</sup>, která specificky transkribuje virovou (-)ssRNA na (+)ssRNA. Jako primer při syntéze obou vláken je použit VPg. Vzniká cirkulární útvar, který je zřejmě potřebný pro zahájení transkripce (Herold a Andino, 2001). Nejprve dochází k syntéze negativního vlákna ((-)ssRNA), jež bude sloužit jako templát pro syntézu



**Obr. 4: Znázornění replikace a transkripce virové RNA.**

V levé části obrázku je znázorněn průběh replikace (+)ssRNA, kdy virová 3D polymeráza syntetizuje komplementární (-)ssRNA vlákno. Dolní část pak naznačuje průběh transkripce, kdy jedno (-)ssRNA vlákno může být současně obsazeno několika polymerázami a dochází tak k syntéze více (+)ssRNA vláken najednou.

V pravém výřezu je znázorněno uspořádání replikačního komplexu, kdy polymeráza využívá cre sekvence a čtyřlístkového motivu, spolu s virovými proteiny 2C a 3A integrovanými v membráně. Červeně označený konec cirkularizovaného komplexu označuje směr syntézy nového vlákna.

Převzato a upraveno z: [https://viralzone.expasy.org/resources/PV\\_replic.jpg](https://viralzone.expasy.org/resources/PV_replic.jpg) a [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Poliovirus\\_life\\_cycle.png/1024px-Poliovirus\\_life\\_cycle.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Poliovirus_life_cycle.png/1024px-Poliovirus_life_cycle.png)



(+)ssRNA. Během syntézy (-)ssRNA dochází současně k transkripci a syntéze komplementárního (+)ssRNA vlákna. Tvorba genomických RNA může probíhat několikanásobně na jednom vlákně (-)ssRNA, vizte Obr. 4.

#### 2.3.4. Enkapsidace a opuštění buňky

Celistvý polyprotein je postupně rozštěpen za pomoci virových proteáz 2A<sup>pro</sup> a 3C<sup>pro</sup> (Obr. 3). Uvolněné segmenty VP0, VP1 a VP3 zůstávají spojeny a formují tak 5 S protomerní podjednotku, která je základní stavební jednotkou kapsidy. 5 protomerních jednotek posléze formuje pentamer (14 S); 12 takto vytvořených pentamerů tvoří 1 prázdnou kapsidu (75 S, prokapsida). Jelikož do ní vstupuje pouze (+)ssRNA, je nepravděpodobné, že VPg funguje jako hlavní faktor ovlivňující balení RNA do kapsidy (Novak a Kirkegaard, 1991). Výzkumy naznačují, že balení RNA do vznikajících kapsid je přímo spojeno s RNA replikací, což by vysvětlovalo selektivní balení pouze pro (+)ssRNA (Nugent *et al.*, 1999).

Po enkapsidaci RNA dochází k rozštěpení VP0 na VP2 a VP4, čímž vzniká prekurzorová částice zvaná provirion. Toto rozštěpení se zdá být autokatalytické povahy, možná s přispěním virové RNA a ostatních kapsidových proteinů (Ansardi *et al.*, 1996; Hogle, 2002). Nejčastěji se PV dostává z buňky ven lytickou cestou pomocí viroporinů (protein 2B)(Agirre *et al.*, 2002), avšak v některých případech může nastat exocytóza virových partikulí pomocí buněčných vezikulů (Bird *et al.*, 2014).

Nově vzniklé viriony mohou poté vstoupit do krevního řečiště a napadnout buňky CNS a způsobit paralýzu. Z napadených intestinálních buněk se virus také uvolňuje zpátky do stolice, čímž opouští hostitele a je schopen se dále šířit. Šíření viru skrze stolicí nakažené osoby může probíhat až několik týdnů (Alexander, Gary a Pallansch, 1997).

#### 2.4. Sérotypy a jejich rozšíření

Existují 3 známé sérotypy PV, označované PV1 (Mahoney), PV2 (Lansing) a PV3 (Leon). Tyto sérotypy jsou definovány na základě odlišností v kapsidových proteinech (Hill, Road a Jolla, 2018). Sérotyp PV2 byl označen za vyhlazený v roce 2015, jelikož byl naposledy zaznamenán v roce 1999. PV3 byl naposledy detekován v roce 2012 a to v oblasti severovýchodní Nigérie. Jeho vyhlazení zatím oznámeno nebylo. Od roku 2012 jsou tedy všechny hlášené případy poliomyelitidy, způsobené divokým poliovirem (wt-PV), zapříčiněny typem 1. Nejvíce ohroženými zeměmi jsou Afghánistán, Pákistán a Nigérie, kde dochází



k opakované cirkulaci onemocnění (World Health Organization (WHO), 2018). Za rok 2018 bylo zaznamenáno celkem 33 případů wt-PV (World Health Organization (WHO), 2019a).

## 2.5. Patogenita a klinické symptomy

Až 95 % nakažených osob vykazuje během primární virémie asymptomatický průběh onemocnění. U zhruba 4-8 % osob dochází po cca 2 týdnech inkubace k sekundární virémii označovanou jako abortivní poliomyelitida, která se projevuje symptomy připomínající chřipku – bolesti hlavy, teploty, bolest v krku apod. V 1 % případů, kdy virus pronikne přes hematoencefalickou bariéru, dochází po několika dnech od propuknutí sekundární virémie k neparalytické aseptické meningitidě, jejíž příznaky jsou ztuhlost svalů v oblasti zad, krku či končetin. U méně než 1 % nakažených dětí se poliomyelitida projeví paralytickou obrnou (Mehndiratta, Mehndiratta a Pande, 2014).

Ze všech výše uvedených forem onemocnění je možné se kompletně uzdravit, avšak v případě paralytické obrny často dochází k dlouhotrvajícím či doživotním následkům, v některých případech i ke smrti. Úmrtnost se pohybuje mezi 5-10 %, příčinou úmrtí bývá selhání respiračního systému (World Health Organization (WHO), 2019b). Přeživší paralyzovaní si však nesou následky po celý život. Zhruba 20 % jich zemře na komplikace spojené s parálýzou, kdy nejčastější příčinou úmrtí je poobrnový syndrom (PPS), onemocnění respiračních cest či GIT a nebo rakovina prsu (Nielsen *et al.*, 2003).

Případy obrny se dělí na 3 typy. Páteční forma, která je nejčastější (79 %), způsobuje kvůli destrukci motorických neuronů jednostranné ochrnutí končetin; nejčastěji dolních (Peters a Lynch, 2001).

Bulbární forma je důsledkem napadení mozkového kmene, tvoří nejmenší procento incidencí (2 %) a dochází k poškození hlavových nervů. Mezi symptomy pak mimo jiné patří problémy s dýcháním a polykáním, ochabnutí obličejových svalů, potíže s mluvením či srdeční arytmii a nestabilní krevní tlak. Uvedené komplikace či jejich kombinace mohou být smrtelné (Peters a Lynch, 2001).

Respirační (bulbospinální) forma s 19% incidencí a největší mortalitou je symptomatickou kombinací předchozích 2 forem projevující se parálýzou především bránice, někdy i končetin. Může dojít i k ovlivnění srdeční funkce. Osoba s ochrnutou bránicí není schopna sama efektivně dýchat a je ve většině případů odkázána na pomoc ventilátoru. Udušení je hlavní příčinou úmrtí u této formy onemocnění (Sjoberg, 1951; Atkinson, W., Hamborsky,

J., McIntyre, L., & Wolfe, S., 2009). Pro udržení naživu takto postižených pacientů bylo v minulosti hojně využíváno takzvaných železných plic, ventilátoru založeném na negativním tlaku.

### **3. Vakcíny proti polioviru**

#### **3.1. Inaktivovaná vakcína**

Inaktivovaná vakcína proti polioviru (IPV) byla vyvinuta Jonasem Salkem během 1. poloviny 50. let 20. století, v roce 1955 pak byla přijata napříč USA pro masovou vakcinaci. Standardně je vyráběna v trivalentní formě, která obsahuje všechny 3 virové sérotypy (PV1, PV2 a PV3) (Pan American Health Organization, 2014). Jelikož se jedná o vakcínu využívající inaktivovaný virus, nemůže v principu dojít ke vzniku paralytické poliomyelitidy asociované s vakcínou (VAPP) či rozšíření polioviru odvozeného z vakcinačních virů (VDPV).

V minulosti však došlo k případům vzniku poliomyelitidy či dokonce úmrtí způsobené podáním IPV, jelikož nebylo zajištěno plné inaktivování virových částic: některé tak dokázaly proces inaktivace přežít a zůstat patogenními (Offitt M.D., 2005). Na základě těchto událostí došlo k zpřísnění kontrol a přidání sekundárního filtračního kroku při výrobě. V dnešní době se tedy jedná o bezpečnou a funkční vakcínu. Díky nemožnosti vzniku VAPP a VDPV je pro plné vymýcení polioviru žádoucí, aby se ve finálním stádiu přešlo pouze na očkování za pomoci IPV.

##### **3.1.1. Příprava, použití a účinnost**

Příprava IPV spočívá nejprve v kultivaci virových částic, což původně probíhalo na opičích ledvinových buňkách. Pro tyto účely ale bylo nutné usmrcení velkého množství zvířat, tudíž se časem od této formy kultivace upustilo. Dnes se využívají ledvinové subkultury, například linie L20B, které jsou vůči poliovirům stabilnější a citlivější (Chapel *et al.*, 2018).

Po nakultivování dostatečného počtu virových částic následuje purifikace a inaktivace pomocí formalínu, kdy míra inaktivace je závislá na koncentraci formaldehydu. Zároveň však ve vyšších koncentracích dochází k snížení antigenicity výsledného produktu (Salk *et al.*, 1954; Salk a Salk, 1984). Při přípravě inaktivované vakcíny je použita kombinace všech 3 sérotypů. Pro výrobu se používají wt kmeny Mahoney nebo Brunenders (PV1), MEF-1 (PV2), a Saukett/Leon (PV3) (Kew *et al.*, 2005).

V dnešní době se pro kultivaci využívá moderních bioreaktorů schopných pojmout tisíce litrů. Lze tak dosáhnout vysoké produkce a zároveň udržení dostupné ceny (van Wezel *et al.*, 2011). Postup na poli nových technologií pak umožňuje dále zdokonalovat a tím i zlevnit proces výroby, což ukazuje například metoda HIP-IPV<sup>TM</sup> (*HIP-IPV: low-cost IPV production process* | Batavia Biosciences Batavia Biosciences, 2019).

Postupný odklon od orální vakcíny proti polioviru (OPV) a zároveň problémy se zásobováním IPV vedly k výzkumu a vyvinutí inaktivované vakcíny používající atenuovaný (Sabin) kmen, jenž je základem pro výrobu OPV. Výroba Sabin-IPV (sIPV) představuje sníženou zátěž pro rozvojové země, jelikož použití méně nebezpečného atenuovaného kmenu nevyžaduje splnění přísných nároků spojených s bezpečností při výrobě (Okayasu *et al.*, 2016). Používání sIPV představuje bezpečnou, účinnou a cenově dostupnou alternativu Salkovy IPV pro plánovanou náhradu OPV během finálních kroků eradikace polioviru (Intravacc, 2016; Ma *et al.*, 2016).

IPV je standartně administrována intramuskulární injekcí, kdy k vakcinaci první dávkou dochází kolem 2 měsíců věku. Před podáním druhé dávky by měly uplynout minimálně 4 týdny. Efektivita očkování po první dávce kolísá zhruba mezi hodnotami 20-60 %, nejefektivnější je proti polioviru typu 2 (Pan American Health Organization, 2014).

Druhá dávka očkování již zajistí 40-93% účinnost proti všem 3 sérotypům polioviru, 90% v případě, že vakcinace byla započata po 8. týdnu věku (Pan American Health Organization, 2014).

Třetí dávka již poté zajišťuje imunizaci s 99% pravděpodobností. Jelikož může úroveň protilátek v krvi v průběhu života klesat, přistupuje se někdy k dodatečným posilujícím dávkám IPV (Robertson, 2005a). Další značnou nevýhodou této vakcíny je nedostatečná tvorba mukosální imunity (Melnick, 1978).

### **3.2. Orální vakcína**

Albert Sabin vyvinul během 50. let 20. století orální poliovirovou vakcínu obsahující atenuovaný virus. S prvními testy na lidech započal již v roce 1954, masivnějšího používání se však vakcína dočkala až v roce 1959, a to očkováním více než 15 milionů lidí v bývalém Sovětském Svazu. Roku 1960 již bylo očkováno zhruba 100 milionů obyvatel východní Evropy, včetně bývalého Československa. Používání OPV v USA se rozšířilo až po roce 1961 (Sabin, 1985).

Od roku 1965 se pro rutinní vakcinaci začala používat trivalentní OPV (tOPV) (Schonberger *et al.*, 2011). Od roku 2009 byla používána také bivalentní verze (bOPV; obsahuje sérotypy 1 a 3 Sabinova viru), v roce 2016 se přešlo k výhradnímu používání bOPV. Tento přechod byl odůvodněn vyhubením wt-PV2 v roce 1999, kdy již nebylo třeba proti tomuto typu očkovat (World Health Organization (WHO), 2016).

### **3.2.1. Příprava, použití a účinnost**

Jedná se o vakcínu založenou na použití živého, atenuovaného viru, jenž je odvozen od wt-PV kmenů pasážováním na opičích ledvinových buňkách. Bylo tak dosaženo vzniku tří vakcinačních kmenů (Sabin 1, 2 a 3). Pro produkci atenuovaných virů se používá například buněčná linie Vero (Montagnon, 1989).

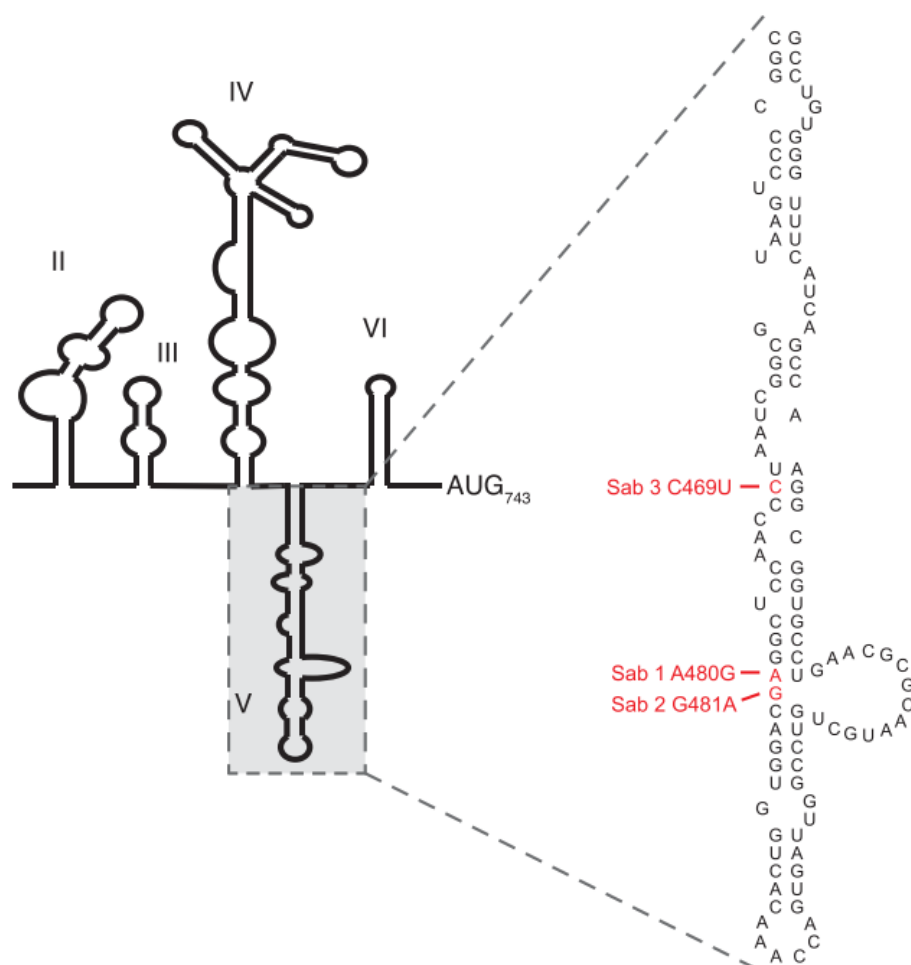
Podání vakcíny se provádí přímo do úst, kdy je podáno cca 0,1 ml (2 kapky) vakcíny. Ceněnou vlastností OPV je možnost imunizovat i jedince, kteří přijdou do kontaktu s příjemcem vakcíny, jelikož se stále jedná o životaschopný virus. Ten se tak může šířit a infikovat další osoby, čímž je imunizuje proti wt-PV. V populacích s nízkou proočkovaností však hrozí vznik VDPD, což představuje hlavní nevýhodu při použití OPV (World Health Organization (WHO), 2016).

### **3.2.2. Změny v GI atenuovaného viru**

Příčinou atenuace vakcinačních kmenů Sabin 1, 2 a 3 jsou především mutace jednoho nukleotidu v IRES sekvenci, konkrétně v 5. doméně. U kmene Sabin 1 se jedná o mutaci na pozici 480 (Kawamura *et al.*, 1989), u Sabin 2 na pozici 481 (Moss, O'Neill a Racaniello, 1989) a u Sabin 3 byla pozice mutace objevena v nukleotidu 472 (Minor *et al.*, 1993). Tato místa odpovídají pozicím u wt kmenů polioviru, jelikož v kmeni Sabin 3 se jedná o pozici 469, jenž je odpovídající právě pozici 472 u WT PV3 (Robertson, 2005b). Konkrétní změny mutací jsou znázorněny na Obr. 5. Mezi další mutace ovlivňující virulenci polioviru se řadí změny v regionech kódujících kapsidové proteiny či 3D<sup>pol</sup> (Friedrich, 1996).

Mutované kmeny jsou stále schopné se efektivně replikovat v buňkách GIT, v nervových buňkách však již nikoliv. Tyto mutace způsobují sníženou vazebnou schopnost eIF4G, eIF4B a proteinu vázajícího polypyrimidinový trakt (PTB), kdy je posléze omezena translační schopnost polioviru (Avanzino *et al.*, 2018). Důležitou roli při translaci hraje eIF4G, protože má za úkol navázání eIF4A, což je RNA-dependentní DEAD-box helikáza.

Avanzino a kol. (2018) ukázali, že mutace ve vakcinačních kmenech snižují vazebnost eIF4G na 5. doménu IRES sekvenční zhruba šestinásobně před rozštěpením eIF4G a čtyřnásobně po rozštěpení. Dále prokázali sníženou afinitu PTB vůči stejné doméně, která se



*Na obrázku jsou červenou barvou označeny konkrétními mutace v jednotlivých kmenech. Pozice 469 u Sabin 3, kdy cytosin je nahrazen uracilem, odpovídá pozici 472 u WT PV3.*

14

nejvíce projevuje u kmene Sabin 3, kdy dochází k čtyřnásobnému snížení. U kmenů Sabin 1 a 2 se jedná pouze o 1,7-násobné snížení (Avanzino *et al.*, 2018).

#### **4. Paralytická poliomyelitida asociovaná s vakcínou**

Onemocnění je klinicky nerozlišitelné od poliomyelitidy způsobené wt-PV. Incidence je zhruba 1 případ na 2,7 milionů administrovaných dávek OPV. Přesný princip vzniku VAPP zatím není znám. Předpokládá se však, že vzniká mutací viru ve střevech očkovaného jedince, kdy dojde k navrácení neurovirulence odpovídající wt-PV. Nejčastější jsou reverzní mutace v oblasti IRES sekvence a v oblasti pro VP1 (Rahimi *et al.*, 2007). U imunodeficientních osob je až 3000x větší šance vzniku VAPP po obdržení OPV (Kew *et al.*, 2005; Martín, 2006). Nedochází ale k rozšíření a cirkulaci viru jako v případě cVDPV, maximálně dojde k nakažení jedince či jedinců kteří jsou ve velmi blízkém kontaktu s postiženým (Global Polio Eradication Initiative (GPEI), 2015).

Příkladem propuknutí VAPP je případ z Kanady popsáný v práci od Desai a kol. (2014). U ročního chlapce došlo k vypuknutí paralytické poliomyelitidy i přes to, že obdržel 2 dávky IPV. Ve věku 5 měsíců při návštěvě v Číně obdržel 3. dávku, která však byla OPV. O 3 týdny později se u něj projeví první příznaky paralýzy: horečka a slabost v končetinách. Po dokončení léčby mu byl zjištěn úbytek inervace svalů levé nohy. Následné vyšetřování dříve odebraných vzorků odhalilo přítomnost polioviru typu 3 s 99,7% homologií k původnímu kmeni obsaženém v OPV (Desai *et al.*, 2014). V tomto případě je možné statisticky odůvodnit detekci typu 3 tím, že ochrana proti němu po 2 dávkách IPV činí zhruba 75 %. Naproti tomu ochrana proti typům 1 a 2 se statisticky pohybuje kolem 90 % (Modlin *et al.*, 2011).

#### **5. Poliovirus odvozený z vakcinačních virů**

Jelikož OPV obsahuje živý, atenuovaný virus, v některých případech dochází kvůli přirozenému mutačnímu potenciálu virů k reverzní mutaci viru, jenž se pak stává virulentním a schopným nakažení neočkovaných osob. V oblastech, kde je nízká proočkovanost populace může poté dojít k lokálnímu vypuknutí poliomyelitidy.

Za VDPV se považuje virový kmen odvozený od OPV, u kterého došlo k určité procentuální změně v genomu pro protein VP1 oproti původnímu, obsaženému ve vakcíně.

Pro sérotypy 1 a 3 se jedná o změnu  $>1\%$ , pro sérotyp 2 musí být změna  $>0,6\%$  (Global Polio Eradication Initiative, 2016). Druhy VDPV se rozdělují na 3 následující kategorie.

Prvním a nejčastějším je cirkulující VDPV (cVDPV). Pro zařazení do této kategorie musí nové izoláty splňovat jednu či více z následujících podmínek, všechny však musí být geneticky příbuzné. Izoláty musí být získány od dvou či více lidí, kteří nežijí ve společné domácnosti; jedné osoby a jednoho či více vzorků z prostředí; z prostředí z minimálně dvou různých míst. Na základě genetické analýzy může dojít k přiřazení izolátu k již existujícímu cVDPV (Nanteza *et al.*, 2018). Od roku 2000 tvořil 13 % zaznamenaných případů cVDPV sérotyp 1, 86 % případů sérotyp 2 a 1 % tvořil sérotyp 3 (Global Polio Eradication Initiative, 2017). Za rok 2018 bylo zaregistrováno celkem 104 případů cVDPV (World Health Organization (WHO), 2019a). Až 90 % případů cVDPV v letech 2011-2015 bylo způsobeno typem 2 Sabinova kmene. Tento faktor přispěl k odstoupení od používání trivalentní orální vakcíny (Diop *et al.*, 2017). Několik míst, kde došlo k vypuknutí cVDPV je znázorněno na Obr. 6.

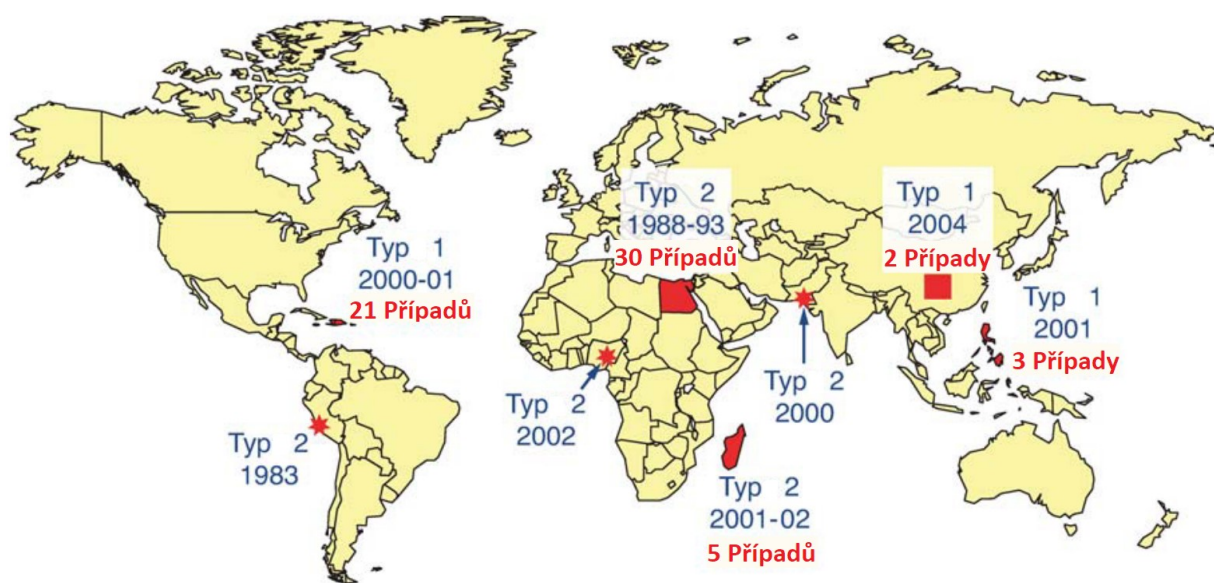
Druhou kategorií VDPV jsou vzorky izolované z osob s primární imunodeficiencí (iVDPV) (Gumede, Muthambi a Schoub, 2012). U těchto osob dochází často k chronické fázi onemocnění, kdy jsou infikované osoby schopny vylučovat virus i několik let od nakažení. Případy iVDPV proto představují značný dlouhodobý risk vůči neočkovaným osobám a všechny identifikované případy jsou důkladně sledovány. Mezi lety 1962 a 2016 zaregistrovala Světová zdravotnická organizace (WHO) celkem 110 případů s podezřením na iVDPV. Přes 90 % procent těchto případů bylo iVDPV s prodlouženým vylučováním či chronické povahy (Macklin *et al.*, 2017).

Nejednoznačné případy VDPV (aVDPV) kategorizujeme na základě izolátů získaných z prostředí bez spojitosti s cVDPV či z osob s fungující imunitou bez příznaků paralytické poliomyelitidy (Nanteza *et al.*, 2018). Později můžeme na základě detekce nových případů přeradit známé aVDPV do jedné z předešlých kategorií.

Příkladem studie VDPD je případ z roku 2004 z Číny (znázorněn na Obr. 6). Jedná se o první zaznamenaný případ vypuknutí obrny způsobené VDPV v této lokalitě. Během tří měsíců byly v provincii Guizhou nahlášeny případy obrny u tří dětí. Pacienti se nacházeli ve dvou vesnicích, od sebe vzdálených 40 km. Žádné z dětí nebylo očkováno, dávku OPV neobdržely ani tři ze čtyř jejich kontaktů. Pozdější průzkumy odhalily velice nízkou

proočkovanost dětí mladších 5 let. V první vesnici nebylo očkováno žádné dítě, ve druhé 64 % dětí bylo vystaveno nebezpečí nákazy (Liang *et al.*, 2006).

Původcem onemocnění byl ve všech případech určen identický VDPV, odvozený od sérotypu Sabin 1. Od výchozího kmene obsaženého v OPV se lišil 9 až 11 nukleotidy v proteinu VP1. Vzhledem ke známé mutační rychlosti vakcinačních kmenů (Famulare *et al.*, 2016) bylo odhadnuto, že virus cirkuloval v populaci méně než 1 rok. Po imunizační kampani uskutečněné o měsíc později nebyl tento kmen cVDPV už nikdy detekován (Liang *et al.*, 2006).



**Obr. 6:** Mapa cVDPV incidentů.

Na obrázku jsou znázorněny místa propuknutí cVDPV mezi lety 1983 až 2004. Hvězdičkou jsou označeny případy aVDPV geneticky podobných k cVDPV, které byly detekovány v oblastech s nízkou proočkovaností.

Převzato a upraveno z: (Kew *et al.*, 2005)

## 6. Nové postupy ve vývoji vakcín

Jak již bylo uvedeno výše, pro úspěšné vymýcení viru poliomyelitidy je nutné v konečné fázi upustit od OPV, jež umožňuje lokální reintrodukcí viru v podobě VDPV a VAPP. Používání výhradně IPV však s sebou nese rizika nedostatečné imunogeneze, především tvorba mukosální imunity není dostatečná. Právě mukosální imunita je důležitým faktorem pro omezení mutačního potenciálu a redukce šíření viru na další hostitele. V zájmu vědeckého výzkumu je vylepšení stávajících vakcín či vývin nových nebo hybridních druhů.



Chan a kol. (2016) studovali možnost posílení imunogeneze IPV na myších subjektech dodatečnými orálními dávkami obsahující kapsidový protein VP1. Tyto dávky sestávaly z lyofilizovaných rostlinných buněk, kdy pro syntézu cílového proteinu vědci využili buněk tabáku (Chan *et al.*, 2016).

U myší, které absolvovaly pouze prvotní imunizaci IPV, došlo po 400 měřených dnech k dramatickému poklesu VP1-IgG1 a VP1-IgA protilátek. Naproti tomu myši posílené orálními dávkami VP1 si dlouhodobě zachovaly vysoké protilátkové titry a byla u nich přítomna značně specifická mukosální imunita, která byla nejefektivnější vůči PV sérotypu 3 (Xiao a Daniell, 2017).

Produkce a distribuce orálně podávané dávky posilující imunitu získanou vakcínací IPV zvyšuje šance na totální eliminaci polioviru bez použití OPV. Skladované lyofilizované rostlinné buňky navíc dlouhodobě neztrácejí na imunogenicitě. Vědcům Daniell, Rai a Xiao (2018) se rovněž podařilo připravit cílový VP1 protein fúzovaný s netoxickou B podjednotkou cholery v chloroplastech salátu. Tento nový způsob přípravy představuje levnou a časově nenáročnou možnost pro produkci imunizačních posilujících dávek (Daniell, Rai a Xiao, 2019).

Další možný způsob vývoje nových vakcín nabízí využití mikro RNA (miRNA). Tyto krátké úseky RNA se v eukaryotických buňkách podílejí na regulaci exprese specifických genů. Tu snižují díky své schopnosti se navázat na komplementární úseky mRNA a označit je tak k degradaci. Pomocí metod genetického inženýrství je možné vpravit do genomu viru sekvence komplementární k miRNA, které jsou v cílových buňkách v převažujícím množství. Po infikování buňky pak dojde k útoku buněčných miRNA na vpravené sekvence a následné degradaci viru (Chumakov a Ehrenfeld, 2008).

## 7. Antivirotika

Postupný ústup od používání OPV ve finálních krocích podporuje výzkum nejen v oblasti nových vakcinačních metod, ale i ve vývoji antivirotik. V roce 2006 tak došlo k zformování Poliovirové Antivirální Iniciativy (PAI), která dohlíží na vývoj, bezpečnost a účinnost nových antivirotik. Hlavním úkolem PAI je vytvoření alespoň dvou druhů antivirotik, které mají odlišný mechanismus účinku.

Potenciál antivirotik je důležitý hlavně v případě lidí trpících imunodeficiencí a postihnutých iVDPV. Jim totiž hrozí po očkování OPV propuknutí infekce, velké riziko pak především představuje uvolňování VDPV do okolí i několik let po primární infekci

(MacLennan *et al.*, 2004). U takto dlouhé chronické nákazy se zvyšuje riziko reverzních mutací a propuknutí cVDPV. Další případné využití můžeme nalézt při výrobě vakcín, tedy pro postexpoziční ochranu personálu v případě nechtěné expozice při výrobním procesu.

Prozatím nejslibněji se jeví následující dvě antivirotika: pocapavir (V-073), který byl objeven v roce 1996 jakožto molekula SCH 48973 (Buontempo *et al.*, 1997) a látka AG7404 (V-7404), která byla popsána v roce 2005 jako analog rupintiviru (Patick *et al.*, 2005).

Pocapavir je látka původně určená k léčbě enterovirálních infekcí, ne však poliovirových. Její účinky vůči PV in vitro byly objeveny později a vzápětí započalo studium této látky pro nové účely. Pocapavir dosahoval výborných výsledků v inhibici známých poliovirových kmenů, jak divokých, tak i vakcinačních (Sabin kmenů) či kmenů od nich odvozených (VDPV) (Oberste *et al.*, 2009). Mechanismus účinku spočívá v blokaci rozbalení virové kapsidy. Inhibitor se váže do vazebného místa kapsidového proteinu VP1, čímž blokuje jeho funkci.

Efektivitu pocapaviru dokázali v kontrolované klinické studii Collet a kol. (2017), kde výsledky ukázaly rychlejší odstranění viru z organismu. U pacientů léčených pocapavirem oproti placebu o více než 20 %, u pacientů s rezistentní formou viru v porovnání s kontrolou dokonce o necelých 60 %. Na konci studie po 45 dnech nebyl virus detekován u žádného z testovaných subjektů. Pocapavir tedy představuje efektivní, časově nenáročnou možnost antivirální podpůrné léčby proti PV (Collett *et al.*, 2017).

AG7404 je látka s antirhinovirální aktivitou fungující i proti PV. Jedná se o inhibitor proteázy 3C, která je klíčová pro štěpení majoritní části virálního polyproteinu (Patick *et al.*, 2005; Rhoden *et al.*, 2013).

Kombinované používání dvou antivirotik s rozdílnými mechanismy účinku snižuje šance viru se přizpůsobit a zvyšuje tak efektivitu léčby. U pocapaviru podávaného samostatně byly hodnoty vzniku resistance vůči léčivu řádově  $10^{-4}$ , AG7404 dosahovala obdobných hodnot. Pokud se však antivirotika podávala současně, došlo k významnému snížení vzniku resistance. Jejich kombinace má navíc synergický efekt a zvyšuje efektivitu léčebného procesu (Rhoden *et al.*, 2013). Přídavnou možností léčby je použití monoklonálních protilátek, použitelných zejména u případů chronických nákaz PV či pro postexpoziční profylaxi (Chen *et al.*, 2011).

## 8. Závěr

Dětská obrna je horkým kandidátem o zařazení mezi vymýcené choroby. Tento virus, který lidstvo provází již několik tisíc let, v poslední době přežívá jen v několika málo oblastech Asie a Afriky. V minulém století se díky velkému zájmu a podpoře veřejnosti (především v USA, slavný Pochod Desetníků (March of Dimes)) podařilo výzkumu polioviru a vývoji vakcín vůči němu získat značných finančních prostředků. Toto spojené lidské úsilí vyústilo ve vznik vakcín, které dostaly poliovirus do dnešního stavu, kdy je na pokraji vyhubení. Přetrvávající problém VAPP či VDPV je intenzivně studován a jsou podnikány kroky pro zamezení jejich vzniku a minimalizaci jejich dopadů.

Jednou z největších hrozeb ohrožujících efektivní vyhlazení polioviru je čím dál častěji se objevující odmítání očkování. Tento rostoucí trend je založen na špatné informovanosti veřejnosti, či dokonce úmyslné dezinformaci. Tento problém se bohužel netýká pouze viru dětské obrny, důsledky odmítání očkování jsou patrné jak v USA, tak i v některých evropských zemích. Zde dochází k nárůstům incidence nemocí jako spalničky či zarděnky, které tak ohrožují životy stovek dětí (Hussain *et al.*, 2018).

Na tomto místě je příhodné se zmínit o Nadaci Billa a Melindy Gatesových (Bill and Melinda Gates Foundation). Tato organizace, založená v roce 2000, se aktivně podílí v boji proti dětské obrně, podporuje výzkum a humanitární pomoc v rizikových oblastech. Do konce roku 2018 jejich podpora výzkumu skrze granty činila částku přes 50 miliard dolarů (Bill & Melinda Gates Foundation, 2019). Současný stav je tedy ze značné části i jejich zásluhou a za to jim jistě právem patří velké díky.

Boj s dětskou obrnou je běh na dlouhou trať, ale cíl se zdá být v dohledné vzdálenosti. Výzkum polioviru v historii přinesl značné poznatky nejen o problematice tohoto onemocnění, ale i o obecných procesech spojených s virálním životním cyklem. Poliovirus se tak stal důležitým nástrojem využívaným dodnes. Rychlost vzniku nových výzkumných metod je závratná a nové postupy budou jistě přínosné i pro tuto problematiku. Věřím, že otázka eliminace dětské obrny bude zodpovězena v několika následujících letech, maximálně 10 let.

## 9. Seznam literatury

- Agirre, A. *et al.* (2002) „Viroporin-mediated Membrane Permeabilization", *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), s. 40434–40441. doi: 10.1074/jbc.m205393200.
- Alexander, J. P., Gary, H. E. a Pallansch, M. A. (1997) „Duration of poliovirus excretion and its implications for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature.", *The Journal of infectious diseases*, 175 Suppl, s. S176-82. doi: 10.1093/infdis/175.supplement\_1.s176.
- Ansardi, D. C. *et al.* (1996) „Poliovirus Assembly and Encapsidation of Genomic RNA", in *Advances in Virus Research*, s. 1–68. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60069-x.
- Atkinson, W., Hamborsky, J., McIntyre, L., & Wolfe, S., E. (2009) „Immunology and Vaccine-Preventable Diseases – Pink Book - Poliomyelitis", *Center for Disease Control*, 5(17), s. 297–310.
- Avanzino, B. C. *et al.* (2018) „Molecular mechanism of poliovirus Sabin vaccine strain attenuation", *Journal of Biological Chemistry*, 293(40), s. 15471–15482. doi: 10.1074/jbc.RA118.004913.
- Basavappa, R. *et al.* (1994) „Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution", *Protein Science*, 3(10), s. 1651–1669. doi: 10.1002/pro.5560031005.
- Belov, G. A. *et al.* (2007) „Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA.", *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 81(2), s. 558–67. doi: 10.1128/JVI.01820-06.
- Belov, G. A. *et al.* (2008) „A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication", *PLoS Pathogens*. Editoval R. Andino, 4(11), s. e1000216. doi: 10.1371/journal.ppat.1000216.
- Bill & Melinda Gates Foundation (2019) *FOUNDATION FACT SHEET*. Dostupné z: <https://www.gatesfoundation.org/Who-We-Are/General-Information/Foundation-Factsheet>.
- Bird, S. W. *et al.* (2014) „Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(36), s. 13081. doi: 10.1073/PNAS.1401437111.
- Bowers, J. R. *et al.* (2017) „Poliovirus Receptor: More than a simple viral receptor", *Virus Research*. NIH Public Access, s. 1–6. doi: 10.1016/j.virusres.2017.09.001.
- de Breyne, S. *et al.* (2008) „Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF5B by enterovirus 3C proteases", *Virology*, 378(1), s. 118–122. doi: 10.1016/j.virol.2008.05.019.
- de Breyne, S. *et al.* (2009) „Direct functional interaction of initiation factor eIF4G with type 1 internal ribosomal entry sites", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 106(23), s. 9197–9202. doi: 10.1073/pnas.0900153106.
- Bubeck, D. *et al.* (2005) „The Structure of the Poliovirus 135S Cell Entry Intermediate at 10-Angstrom Resolution Reveals the Location of an Externalized Polypeptide That Binds to Membranes", *Journal of Virology*. American Society for Microbiology (ASM), 79(12), s. 7745–7755. doi: 10.1128/jvi.79.12.7745-7755.2005.

Buontempo, P. J. *et al.* (1997) „SCH 48973: a potent, broad-spectrum, antienterovirus compound.", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(6), s. 1220–1225. doi: 10.1128/AAC.41.6.1220.

Castelló, A. *et al.* (2009) „RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage.", *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 122(Pt 20), s. 3799–809. doi: 10.1242/jcs.055988.

Chan, H. T. *et al.* (2016) „Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes", *Plant Biotechnology Journal*, 14(11), s. 2190–2200. doi: 10.1111/pbi.12575.

Chapel, C. *et al.* (2018) „Replacement of primary monkey kidney cells by L20B cell line in the test for effective inactivation of inactivated poliovirus vaccine", *Journal of Virological Methods*. Elsevier, 256, s. 77–84. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.03.004.

Chen, Z. *et al.* (2011) „Chimpanzee-human monoclonal antibodies for treatment of chronic poliovirus excretors and emergency postexposure prophylaxis", *Journal of Virology*, 85(9), s. 4354–4362. doi: 10.1128/JVI.02553-10.

Chumakov, K. a Ehrenfeld, E. (2008) „Vaccines: New Generation of Inactivated Poliovirus Vaccines for Universal Immunization after Eradication of Poliomyelitis", *Clinical Infectious Diseases*. NIH Public Access, 47(12), s. 1587–1592. doi: 10.1086/593310.

Collett, M. S. *et al.* (2017) „Antiviral Activity of Pocapavir in a Randomized, Blinded, Placebo-Controlled Human Oral Poliovirus Vaccine Challenge Model.", *The Journal of infectious diseases*. Oxford University Press, 215(3), s. 335–343. doi: 10.1093/infdis/jiw542.

Daniell, H., Rai, V. a Xiao, Y. (2019) „Cold chain and virus-free oral polio booster vaccine made in lettuce chloroplasts confers protection against all three poliovirus serotypes", *Plant Biotechnology Journal*, 17(7), s. 1357–1368. doi: 10.1111/pbi.13060.

Desai, S. *et al.* (2014) „An unusual case of vaccine-associated paralytic poliomyelitis", *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. Hindawi Limited, 25(4), s. 227–228. doi: 10.1155/2014/378320.

Diop, O. M. *et al.* (2017) „Virologic Monitoring of Poliovirus Type 2 after Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017", *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. Centers for Disease Control and Prevention, 66(20), s. 538–542. doi: 10.15585/mmwr.mm6620a4.

Famulare, M. *et al.* (2016) „Sabin Vaccine Reversion in the Field: a Comprehensive Analysis of Sabin-Like Poliovirus Isolates in Nigeria", *Journal of Virology*. American Society for Microbiology (ASM), 90(1), s. 317–331. doi: 10.1128/jvi.01532-15.

Friedrich, F. (1996) „Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees.", *Acta virologica*, 40(3), s. 157–70.

Galassi, F. M., Habicht, M. E. a Rühli, F. J. (2017) „Poliomyelitis in Ancient Egypt?", *Neurological Sciences*. Springer Milan, s. 375. doi: 10.1007/s10072-016-2720-9.

Global Polio Eradication Initiative (2016) *Classification and reporting of vaccine-derived polioviruses (VDPV) - GPEI guidelines*. Dostupné z: [http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/09/Reporting-and-Classification-of-VDPVs\\_Aug2016\\_EN.pdf](http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/09/Reporting-and-Classification-of-VDPVs_Aug2016_EN.pdf).

Global Polio Eradication Initiative (2017) *Fact sheet: GPEI cVDPV-factsheet*. Dostupné z: [http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/09/GPEI-cVDPV-factsheet\\_September-2017.pdf](http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/09/GPEI-cVDPV-factsheet_September-2017.pdf).

Global Polio Eradication Initiative (GPEI) (2015) *Vaccine-associated paralytic polio (VAPP) and vaccine-derived poliovirus (VDPV), Fact Sheet*. Dostupné z: [https://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame\\_objective2/oral\\_polio\\_vaccine/VAPPandcVDPVFactSheet-Feb2015.pdf](https://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame_objective2/oral_polio_vaccine/VAPPandcVDPVFactSheet-Feb2015.pdf).

Goodfellow, I. *et al.* (2002) „Identification of a cis-Acting Replication Element within the Poliovirus Coding Region", *Journal of Virology*, 74(10), s. 4590–4600. doi: 10.1128/jvi.74.10.4590-4600.2000.

Gradi, A. *et al.* (1998) „Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 95(19), s. 11089–11094. doi: 10.1073/pnas.95.19.11089.

Gulevich, A. Y., Yusupova, R. A. a Drygin, Y. F. (2002) „VPg unlinkase, the phosphodiesterase that hydrolyzes the bond between VPg and picornavirus RNA: A minimal nucleic moiety of the substrate", *Biochemistry (Moscow)*, 67(6), s. 615–621. doi: 10.1023/A:1016124202274.

Gumede, N., Muthambi, V. a Schoub, B. D. (2012) „Immunodeficiency-associated vaccine-derived poliovirus type 3 in infant, South Africa, 2011", *Emerging Infectious Diseases*, 18(6), s. 992–994. doi: 10.3201/eid1806.120037.

Herold, J. a Andino, R. (2001) „Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge", *Molecular Cell*. Cell Press, 7(3), s. 581–591. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00205-2.

Hill, H., Road, L. a Jolla, L. (2018) „Antigenic Structure of Polioviruses of Serotypes 1, 2 and 3", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(1986), s. 1283–1291. doi: 10.1073/pnas.74.1.59.

*HIP-IPV: low-cost IPV production process | Batavia Biosciences* Batavia Biosciences (2019). Dostupné z: <https://www.bataviabiosciences.com/hip-ipv-production-process/>.

Hogle, J. M. (2002) „Poliovirus Cell Entry: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways", *Annual Review of Microbiology*. NIH Public Access, 56(1), s. 677–702. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160757.

Hogle, J. M., Chow, M. a Filman, D. J. (1985) „Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution", *Science*, 229(4720), s. 1358–1365. doi: 10.1126/science.2994218.

Holland, J. J. a McLaren, L. C. (1961) „THE LOCATION AND NATURE OF ENTEROVIRUS RECEPTORS IN SUSCEPTIBLE CELLS", *The Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 114(2), s. 161.

Honda, M. *et al.* (1999) „A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation.", *Journal of virology*, 73(2), s. 1165–74.

Hsu, N. Y. *et al.* (2010) „Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication", *Cell*, 141(5), s. 799–811. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.050.

Hussain, A. *et al.* (2018) „The Anti-vaccination Movement: A Regression in Modern Medicine", *Cureus*. doi: 10.7759/cureus.2919.

Ida-Hosonuma, M. *et al.* (2003) „Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution", *Archives of Virology*. Springer-Verlag, 148(1), s. 29–44. doi: 10.1007/s00705-002-0910-7.

Intravacc (2016) *Development of inactivated polio vaccine derived from attenuated Sabin strains*. Dostupné z: <https://www.intravacc.nl/media/1234/20160718-factsheet-sabin-ipv.pdf>.

Joklik, W. K. a Darnell, J. E. (1961) „The adsorption and early fate of purified poliovirus in HeLa cells", *Virology*, 13(4), s. 439–447. doi: 10.1016/0042-6822(61)90275-6.

Kawamura, N. *et al.* (1989) „Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype", *Journal of Virology*, 63(3), s. 1302–1309.

Kew, O. M. *et al.* (2005) „VACCINE-DERIVED POLIOVIRUSES AND THE ENDGAME STRATEGY FOR GLOBAL POLIO ERADICATION", *Annual Review of Microbiology*, 59(1), s. 587–635. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123625.

Lamphear, B. J. *et al.* (1995) „Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for Cap-dependent and Cap-independent translational initiation", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 270(37), s. 21975–21983. doi: 10.1074/jbc.270.37.21975.

Lee, K. A. a Sonenberg, N. (2006) „Inactivation of cap-binding proteins accompanies the shut-off of host protein synthesis by poliovirus.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(11), s. 3447–3451. doi: 10.1073/pnas.79.11.3447.

Liang, X. *et al.* (2006) „An Outbreak of Poliomyelitis Caused by Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus in China", *The Journal of Infectious Diseases*. Narnia, 194(5), s. 545–551. doi: 10.1086/506359.

Lulla, V. *et al.* (2019) „An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells", *Nature Microbiology*. Europe PMC Funders, 4(2), s. 280–292. doi: 10.1038/s41564-018-0297-1.

Lyle, J. M. *et al.* (2002) „Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices", *Science*, 296(5576), s. 2218–2222. doi: 10.1126/science.1070585.

Ma, L. *et al.* (2016) „Analyzed immunogenicity of fractional doses of Sabin-inactivated poliovirus vaccine (sIPV) with intradermal delivery in rats", *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor & Francis, 12(12), s. 3125–3131. doi: 10.1080/21645515.2016.1214347.

Macklin, G. *et al.* (2017) „Prolonged excretion of poliovirus among individuals with primary immunodeficiency disorder: An analysis of the World Health Organization registry", *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA, 8(SEP), s. 1103. doi: 10.3389/fimmu.2017.01103.

MacLennan, C. *et al.* (2004) „Failure to clear persistent vaccine-derived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man", *Lancet*, 363(9420), s. 1509–1513. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16150-3.

Maier, M. K. *et al.* (2007) „The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens", *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 37(8), s. 2214–2225. doi: 10.1002/eji.200737072.

Martín, J. (2006) „Vaccine-derived poliovirus from long term excretors and the end game of polio eradication", *Biologicals*, 34(2), s. 117–122. doi: 10.1016/j.biologicals.2006.02.005.

Mehndiratta, M. M., Mehndiratta, P. a Pande, R. (2014) „Poliomyelitis: Historical Facts, Epidemiology, and Current Challenges in Eradication", *The Neurohospitalist*. SAGE Publications, 4(4), s. 223–229. doi: 10.1177/1941874414533352.

Melnick, J. L. (1978) „Advantages and disadvantages of killed and live poliomyelitis vaccines.", *Bulletin of the World Health Organization*, 56(1), s. 21–38.

Minor, P. D. *et al.* (1993) „Genetic basis of attenuation of the Sabin oral poliovirus vaccines", *Biologicals*, 21(4), s. 357–363. doi: 10.1006/biol.1993.1096.

Modlin, J. F. *et al.* (2011) „Humoral and Mucosal Immunity in Infants Induced by Three Sequential Inactivated Poliovirus Vaccine-Live Attenuated Oral Poliovirus Vaccine Immunization Schedules", *Journal of Infectious Diseases*, 175(Supplement 1), s. S228–S234. doi: 10.1093/infdis/175.supplement\_1.s228.

Montagnon, B. J. (1989) „Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line.", *Developments in biological standardization*, 70, s. 27–47.

Moss, E. G., O'Neill, R. E. a Racaniello, V. R. (1989) „Mapping of attenuating sequences of an avirulent poliovirus type 2 strain", *Journal of Virology*, 63(5), s. 1884–1890.

Nanteza, M. B. *et al.* (2018) „The detection of 3 ambiguous type 2 vaccine-derived polioviruses (VDPV2s) in Uganda", *Virology Journal*. BioMed Central, 15(1), s. 77. doi: 10.1186/s12985-018-0990-y.

Nielsen, N. M. *et al.* (2003) „Long-term mortality after poliomyelitis.", *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 14(3), s. 355–60.

Nomoto, A. *et al.* (1977) „The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis", *Nature*, 268(5617), s. 208–213. doi: 10.1038/268208a0.

Nomoto, A. (1982) „Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome (vaccine strain of poliovirus/molecular cloning/genome sequence/mutation sites)", *Biochemistry*, 79, s. 5793–5797.

Novak, J. E. a Kirkegaard, K. (1991) „Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells.", *Journal of virology*, 65(6), s. 3384–7.

Nugent, C. I. *et al.* (1999) „Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA.", *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 73(1), s. 427–35.

Oberste, M. S. *et al.* (2009) „In vitro antiviral activity of V-073 against polioviruses", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), s. 4501–4503. doi: 10.1128/AAC.00671-09.

Offitt M.D., P. A. (2005) *The Cutter Incident: How America's First Polio Vaccine Led to the Growing Vaccine Crisis eBook: Dr. Paul A. Offit M.D.: Kindle Store*. Yale University Press.



Okayasu, H. *et al.* (2016) *Development of inactivated poliovirus vaccine from Sabin strains: A progress report*, Biologicals. Academic Press. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.08.005.

Pan American Health Organization (2014) *Inactivated Poliovirus Vaccine (IPV) Introduction Practical Guide*. Dostupné z: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/Polio-ipv-2014-eng.pdf>.

Pathak, H. B. *et al.* (2008) „Picornavirus Genome Replication", *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), s. 30677–30688. doi: 10.1074/jbc.M806101200.

Patick, A. K. *et al.* (2005) „In Vitro Antiviral Activity and Single-Dose Pharmacokinetics in Humans of a Novel, Orally Bioavailable Inhibitor of Human Rhinovirus 3C Protease", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), s. 2267–2275. doi: 10.1128/AAC.49.6.2267-2275.2005.

Paul, A. V. *et al.* (1998) „Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase", *Nature*, 393(6682), s. 280–284. doi: 10.1038/30529.

Peters, C. a Lynch, M. (2001) *The Late Effects of Polio: Information for General Practicioners*. Queensland Health.

Rahimi, P. *et al.* (2007) „Characterization of mutations in the VP1 region of Sabin strain type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis cases in Iran", *Journal of Clinical Virology*, 39(4), s. 304–307. doi: 10.1016/j.jcv.2007.04.017.

Ren, R. *et al.* (1990) „Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: A new model for poliomyelitis", *Cell*, 63(2), s. 353–362. doi: 10.1016/0092-8674(90)90168-E.

Ren, R. a Racaniello, V. R. (1992) „Human poliovirus receptor gene expression and poliovirus tissue tropism in transgenic mice.", *Journal of virology*, 66(1), s. 296–304.

Rhoden, E. *et al.* (2013) „Anti-poliovirus activity of protease inhibitor AG-7404, and assessment of in vitro activity in combination with antiviral capsid inhibitors", *Antiviral Research*, 98(2), s. 186–191. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.003.

Rivera, C. I. a Lloyd, R. E. (2008) „Modulation of enteroviral proteinase cleavage of poly(A)-binding protein (PABP) by conformation and PABP-associated factors", *Virology*, 375(1), s. 59–72. doi: 10.1016/j.virol.2008.02.002.

Robertson, S. (2005a) „The Immunological Basis for Immunization Series Poliomyelitis GLOBAL PROGRAMME FOR VACCINES AND IMMUNIZATION", *The Immunological Basis for Immunization Series*, s. 1–21.

Robertson, S. (2005b) „The Immunological Basis for Immunization Series Poliomyelitis GLOBAL PROGRAMME FOR VACCINES AND IMMUNIZATION", *The Immunological Basis for Immunization Series*, 279(11), s. 1–21. doi: 10.1074/jbc.M307806200.

Rust, R. C. *et al.* (2001) „Cellular COPII Proteins Are Involved in Production of the Vesicles That Form the Poliovirus Replication Complex", *Journal of Virology*, 75(20), s. 9808–9818. doi: 10.1128/jvi.75.20.9808-9818.2001.

Sabin, A. B. (1985) „Oral poliovirus vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world", *Journal of Infectious Diseases*, 151(3), s. 420–436. doi: 10.1093/infdis/151.3.420.

Salk, D. a Salk, J. (1984) „Vaccinology of poliomyelitis", *Vaccine*. Elsevier, s. 59–74. doi: 10.1016/S0264-410X(98)90035-4.

Salk, J. E. *et al.* (1954) „Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines.", *American journal of public health*, 44(5), s. 563–570. doi: 10.2105/AJPH.44.5.563.

Salonen, A., Ahola, T. a Kääriäinen, L. (2005) „Viral RNA Replication in Association with Cellular Membranes", in *Membrane Trafficking in Viral Replication*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, s. 139–173. doi: 10.1007/3-540-26764-6\_5.

Schonberger, L. B. *et al.* (2011) „Control of Paralytic Poliomyelitis in the United States", *Clinical Infectious Diseases*, 6(Supplement\_2), s. S424–S426. doi: 10.1093/clinids/6.supplement\_2.s424.

Sjoberg, A. (1951) „The suffocation symptomatology of bulbo-spinal poliomyelitis and experience of its operative treatment", *Acta Oto-Laryngologica*, 39(S95), s. 291–300. doi: 10.3109/00016485109128021.

Skern, T. (2010) „100 Years poliovirus: From discovery to eradication. A meeting report", *Archives of Virology*. Springer Vienna, s. 1371–1381. doi: 10.1007/s00705-010-0778-x.

Trevelyan, B., Smallman-Raynor, M. a Cliff, A. D. (2005) „The spatial dynamics of poliomyelitis in the United States: From epidemic emergence to vaccine-induced retreat, 1910–1971", *Annals of the Association of American Geographers*, s. 269–293. doi: 10.1111/j.1467-8306.2005.00460.x.

Tuthill, T. J. *et al.* (2010) „Picornaviruses", *Current Topics in Microbiology and Immunology*. NIH Public Access, 343(1), s. 43–89. doi: 10.1007/82-2010-37.

van Wezel, A. L. *et al.* (2011) „Inactivated Poliovirus Vaccine: Current Production Methods and New Developments", *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press, 6(Supplement\_2), s. S335–S340. doi: 10.1093/clinids/6.supplement\_2.s335.

World Health Organization (WHO) (2016) *Weekly epidemiological record*. Dostupné z: <https://www.who.int/wer/2016/wer9112.pdf>.

World Health Organization (WHO) (2018) *Eradication of poliomyelitis: Report by the Director-General*. Dostupné z: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA71/A71\\_26-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA71/A71_26-en.pdf).

World Health Organization (WHO) (2019a) *Polio Now – GPEI, World Health Organization*. Dostupné z: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/>.

World Health Organization (WHO) (2019b) *Poliomyelitis*. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>.

Xiao, Y. a Daniell, H. (2017) „Long-term evaluation of mucosal and systemic immunity and protection conferred by different polio booster vaccines", *Vaccine*, 35(40), s. 5418–5425. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.12.061.